ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ / ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.17816/MAJ637237 EDN: PCBNIB

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ЭНДОСОМАЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ЦИТОЗОЛЬНЫХ СЕНСОРОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ У МЫШЕЙ

В.А. Олейник[1, 2], М.А. Плотникова[1], Н.Д. Ёлшин[1], Е.А. Романовская-Романько[1], С.А. Клотченко[1]

[1] Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия;
[2] Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Олейник В.А., Плотникова М.А., Ёлшин Н.Д., Романовская-Романько Е.А., Клотченко С.А. Разработка и апробация количественной ПЦР-системы для изучения экспрессии эндосомальных рецепторов и цитозольных сенсоров нуклеиновых кислот у мышей // Медицинский академический журнал. 2025. Т. 25. № 1. С. 90–100. DOI: 10.17816/MAJ637237 EDN: PCBNIB

Рукопись получена: 19.10.2024 Рукопись одобрена: 14.11.2024 Опубликована online: 31.03.2025

Обоснование. Врожденный иммунный ответ играет важнейшую роль в защите организма от вирусных патогенов, и важная его часть — паттерн-распознающие рецепторы, такие как толл- и RIG-I-подобные. Известно, что инвазия вирусов, в том числе вируса гриппа, приводит к активации внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов, таких как TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме, эндосомах и лизосомах, а также MDA5 и RIG-I — цитозольных сенсоров вирусной РНК, не связанных с мембранами клетки. Экспрессия этих генов, адекватное их функционирование и регуляция имеет колоссальное значение для обеспечения адекватного иммунного ответа и формирования противовирусной защиты.

Цель — разработка и апробация количественной ПЦР-системы для оценки экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9, MDA5, RIGI* в тканях и органах мыши.

Материалы и методы. Изучение уровней экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, используя разработанные панели праймеров и флуоресцентных зондов. Для апробации были выбраны самки инбредной линии мышей-альбиносов BALB/c в возрасте 8–10 нед., зараженные вирусом гриппа A/PR8/34 (H1N1).

Результаты. В ходе исследования была разработана тест-система на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции для оценки экспрессии генов эндосомальных рецепторов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, а также цитозольных сенсоров MDA5 и RIG-I, эффективность амплификации которых составила 99 (*TLR3*), 106 (*TLR7*) и по 107% для остальных генов. Данная тест-система была применена для исследования уровней экспрессии TLRs и RLRs в тканях легких и селезенок мышей линии BALB/c при заражении вирусом гриппа A/PR8/34 (H1N1). Согласно полученным результатам, через 24 ч после инфицирования было показано достоверное изменение уровней мРНК TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 и MDA5 в легких, но не в селезенках зараженных животных.

Заключение. Разработанная тест-система может быть применена для анализа экспрессии некоторых внутриклеточных PRRs, что открывает возможности для более глубокого изучения патофизиологических механизмов развития иммунного ответа.

Ключевые слова: грипп; мультиплексная полимеразная цепная реакция; паттерн-распознающие рецепторы; толл-подобные рецепторы; RIG-I-подобные рецепторы; эндосомальные рецепторы; цитозольные сенсоры.

DEVELOPMENT AND APPROBATION OF A QUANTITATIVE PCR SYSTEM FOR STUDYING THE EXPRESSION OF ENDOSOMAL RECEPTORS AND CYTOSOLIC NUCLEIC ACID SENSORS IN MICE

Veronika A. Oleynik[1,2], Marina A. Plotnikova[1], Nikita D. Yolshin[1], Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko[1], Sergey A. Klotchenko[1]

[1] Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia;
[2] Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint Petersburg, Russia

For citation: Oleynik VA, Plotnikova MA, Yolshin ND, Romanovskaya-Romanko EA, Klotchenko SA. Development and approbation of a quantitative PCR system for studying the expression of endosomal receptors and cytosolic nucleic acid sensors in mice. *Medical Academic Journal.* 2025;25(1):90–100. DOI: 10.17816/MAJ637237 EDN: PCBNIB

Submitted: 19.10.2024 Accepted: 14.11.2024 Published online: 31.03.2025

BACKGROUND: The innate immune response plays a crucial role in protecting the organism against viral pathogens, important part of which are pattern recognition receptors, such as Toll-like and RIG-I-like receptors. It is known that viral invasion, including influenza virus infection, leads to the activation of intracellular pattern recognition receptors

Список сокращений

PRRs — паттерн-распознающие рецепторы; TLRs — толл-подобные рецепторы; RLRs — RIG-I-подобные рецепторы; ВГА — вирус гриппа A/PR8/34 (H1N1).

such as TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9, which are localized in the endoplasmic reticulum, endosomes, and lysosomes, as well as MDA5 and RIG-I, which are cytosolic sensors of viral RNA not associated with cell membranes. The expression of these genes, their proper functioning, and regulation are of critical importance for ensuring an adequate immune response and the establishment of antiviral protection.

AIM: The aim of this study is to develop and validate a quantitative PCR system for assessing the expression of *TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MDA5,* and *RIGI* genes in mouse tissues and organs.

METHODS: Gene expression levels were analyzed using reverse transcription polymerase chain reaction with specially developed panels of primers and fluorescent probes. For approbation were selected female inbred BALB/c albino mice aged 8–10 weeks, infected with influenza A/PR8/34 (H1N1) virus.

RESULTS: In this study, a test system based on multiplex polymerase chain reaction was developed for assessing the expression of endosomal receptor genes *TLR3, TLR7, TLR8,* and *TLR9,* as well as cytosolic sensors MDA5 and RIG-I. The amplification efficiency was 99 for *TLR3*, 106 for *TLR7*, and 107% for the remaining genes. This test system was used to study the expression levels of TLRs and RLRs in the lung and spleen tissues of BALB/c mice infected with influenza A/PR8/34 (H1N1) virus. According to the obtained results, 24 hours post-infection, a significant change in mRNA levels of TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, and MDA5 was observed in the lungs but not in the spleens of infected animals.

CONCLUSION: The developed test system can be used for analyzing the expression of certain intracellular PRRs, providing opportunities for a deeper investigation of the pathophysiological mechanisms underlying the immune response.

Keywords: influenza; multiplex polymerase chain reaction; pattern recognition receptors; Toll-like receptors; RIG-I-like receptors; endosomal receptors; cytosolic sensors.

Обоснование

Врожденный иммунный ответ играет важнейшую роль в защите организма от вирусных патогенов, и основа его функционирования — паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), такие как толл- (TLRs) и RIG-I-подобные (RLRs). Известно, что инвазия вирусов, в том числе вируса гриппа, приводит к активации внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов, таких как TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме, эндосомах и лизосомах [1], а также MDA5 и RIG-I — цитозольных сенсоров вирусной РНК, не связанных с мембранами клетки [2, 3].

Различная внутриклеточная локализация и функции этих рецепторов обеспечивают широкий спектр ответов на вирусные патогены. TLR3 распознает двухцепочечную РНК, TLR7 и TLR8 — одноцепочечную РНК, а TLR9 — неметилированные CpG-мотивы в вирусных молекулах ДНК [4]. MDA5 и RIG-I также участвуют в распознавании дцРНК, но различают вирусные молекулы по их длине: MDA5 распознает длинные фрагменты (>1000 п.н.), а RIG-I — короткие (<1000 п.н.). Эти рецепторы активируют различные сигнальные пути, включая MyD88- и TRIF-зависимые каскады, что приводит к выработке воспалительных цитокинов и интерферонов I типа [5]. Исследования показывают, что экспрессия генов *TLRs* и *RLRs* наблюдается не только в иммунных клетках (макрофагах, дендритных клетках, нейтрофилах), но и в различных тканях, таких как легкие, печень, селезенка, сердце [6], что подчеркивает их значимость в защите организма от вирусных инфекций как на местном, так и на системном уровнях.

Мыши — наиболее распространенные модельные организмы, используемые как для изучения иммунологических процессов, возникающих при инфицировании вирусом гриппа, так и для исследования новых противовирусных препаратов.

Наша работа посвящена созданию количественной ПЦР-системы, позволяющей оценивать уровни экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5, RIGI* в различных органах и тканях мыши. Мы полагаем, что такой инструмент расширит возможности понимания механизмов врожденного противовирусного ответа при патологических процессах и позволит оценить развитие иммунного ответа при разработке противовирусных вакцин. В качестве апробации мы применили нашу систему для исследования уровней экспрессии этих генов в легких и селезенках мышей линии BALB/c в ответ на интраназальное инфицирование патогенным штаммом вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1) (ВГА).

Цель — разработка и апробация количественной ПЦР-системы для оценки экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5, RIGI* в тканях и органах мыши.

Материалы и методы

В исследовании использовали самок инбредной линии мышей-альбиносов BALB/c в возрасте 8–10 нед., полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Выполнение исследования было одобрено биоэтической комиссией ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (протокол № 27 от 07.12.2023). Опытная группа была интраназально инфицирована ВГА в дозе 5,0 lg $ЭИД_{50}$ на одно животное в объеме 30 мкл, а контрольной группе мышей вводили эквивалентный объем фосфатно-солевого буфера.

Выборка в каждой группе составила 5 животных. Введение проводили под легкой эфирной анестезией. Вирусный штамм ВГА был получен из «Коллекции вирусов и клеточных культур» ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Забор легких и селезенок для экстракции препаратов РНК осуществляли в раствор для стабилизации клеточной РНК в тканях и органах IntactRNA (Евроген, Россия) через 24 ч после инфицирования. Тотальная РНК была экстрагирована из ткани легких и селезенок мышей с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрация полученной РНК были проверены на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). По значению A260/280 (в норме $\geqslant$1,9) оценивали степень очистки РНК. Целостность полученной РНК была подтверждена путем проведения электрофореза в 1% агарозном геле [7].

Для удаления геномной ДНК, которой могут быть контаминированы препараты тотальной РНК после выделения препаратом ExtractRNA, проводили обработку образцов ДНКазой. Все этапы инкубации были проведены с использованием термолабильной ДНКазы (Биолабмикс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. В реакцию брали 2,5 мкг тотальной РНК. Для реакции обратной транскрипции было использовано 2,5 мкг тотальной РНК сразу после обработки ДНКазой. Для синтеза кДНК использовали набор реагентов RNAscribe RT (Биолабмикс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. К 2,5 мкг РНК добавляли 1 мкг олиго-$(dT)_{16}$ праймеров и доводили водой до объема 13 мкл. Полученную смесь инкубировали 5 мин при температуре 70°C для отжига праймеров и охлаждали во льду в течение 2 мин. Далее к 13 мкл пробы добавляли 12 мкл смеси, содержащей M-MuLV ревертазы в количестве 200 единиц и 5-кратный буфер для обратной транскрипции. Получившуюся смесь инкубировали 1 ч при 55°C с последующей инактивацией фермента при 85°C в течение 5 мин. Продукты обратной транскрипции разбавляли водой до объема 50 мкл и хранили при –20°C до использования.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием готового набора БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолабмикс, Россия). Праймеры и олигонуклеотидные зонды были синтезированы в компании ДНК-Синтез (Россия). Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем по 5 пмоль прямого и обратного праймеров и 0,25 пмоль TaqMan-зонда, а также 5 мкл кДНК, полученной в процессе обратной транскрипции. Для проведения ПЦР использовали двухступенчатый температурный профиль: первичная денатурация 95°C в течение 5 мин, далее 40 двухступенчатых циклов: денатурация 95°C — 10 с, отжиг праймеров и элонгация 60°C — 30 с. Амплификацию проводили в термоциклере Gentier 96E (Tianlong Y010H, Китай), детекцию Ct проводили при пороговом значении флуоресценции 100 RFU.

Эффективность амплификации генов рассчитывали по углу наклона стандартной кривой. Для каждого из десяти ампликонов (включая гены «домашнего хозяйства») TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MDA5 и RIG-I, а также Hprt, Rplp0, Ubc и GAPDH, готовили серию 10-кратных разведений и проводили ПЦР с использованием двух наборов специфических праймеров и зондов (мультиплексный формат). Для полученных линейных функций ($y=\alpha\times x+b$), отражающих зависимость цикла ПЦР от логарифма разведения образца, были определены углы наклона α. Далее эффективность рассчитывали по формуле $E(\%)=(E-1)\times 100\%$.

Относительная экспрессия генов была рассчитана с использованием метода $\Delta\Delta Ct$, где для нормализации количества мРНК применяли среднее арифметическое для всех нормировочных генов за исключением *GAPDH*, поскольку его пороговые циклы показали низкую корреляцию с пороговыми циклами других нормировочных генов (рис. 1). Относительный уровень экспрессии вычисляли по формуле $R=2^{-[\Delta\Delta Ct]}$. Все расчеты проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel. Для оценки статистической достоверности различий применяли непарный *t*-тест Стьюдента с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.

Результаты

Первоначально был проведен дизайн праймеров и олигонуклеотидных зондов, специфически выявляющих матричную РНК генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5* и *RIGI* мыши, последовательности которых были взяты из базы данных NCBI. Оригинальные последовательности праймеров (табл. 1) были подобраны к белок-кодирующей области генов таким образом, чтобы они были разделены областью интрона, температуры их плавления были схожи, а длины ампликонов, образующихся в процессе ПЦР, не превышали 200 п.н. В качестве эндогенных контролей, используемых для нормировки, были предложены так называемые гены домашнего хозяйства: ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*Hprt*), убиквитина-С (*Ubc*) и большой субъединицы рибосомы P0 (*Rplp0*).

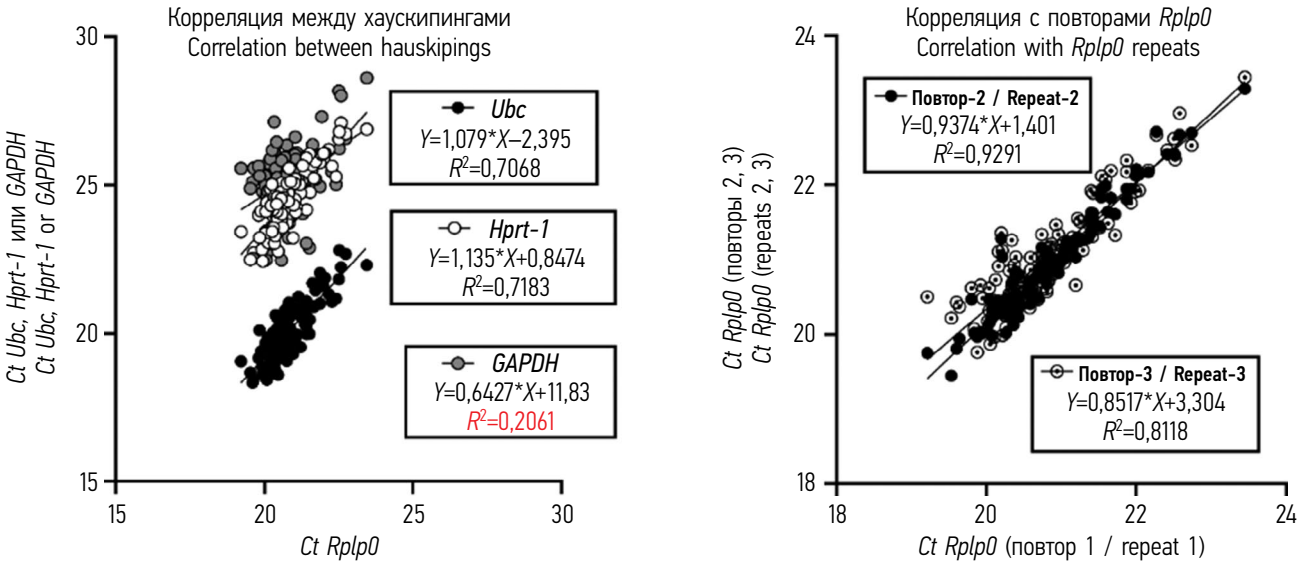

Рис. 1. Корреляционная зависимость, отражающая статистическую взаимосвязь пороговых циклов ПЦР (*Ct*) для всех нормировочных генов.

Fig. 1. Correlation dependence reflecting the statistical relationship of PCR threshold cycles (*Ct*) for all reference genes.

Таблица 1 / Table 1

Подобранные праймеры и TaqMan-зонды для определения экспрессии генов *TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MDA5* и *RIGI*
Selected primers and TaqMan probes for determining the expression of *TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MDA5,* and *RIGI* genes

Ген	мРНК	Последовательности праймеров и TaqMan-зондов, 5′-3′		Длина продукта ПЦР, п.н.
TLR3	NM_126166.5 NM_001357317.1 NM_001357316.1	F	TGGTCACCAACTGGCTATTAAA	88
		R	CCATCTATCACTGTGGCTCTTC	
		P	FAM-ACCCATGCCTGAGTAGTCTTCTCTGA-BHQ	
TLR7	NM_001290758.1 NM_001290755.1 NM_001290757.1 NM_001290756.1 NM_133211.4 NM_177354.4	F	TCATGTGCCATGCTCAGTT	117
		R	GGCAGATGTGTGGCTCTTAT	
		P	FAM-TGTGCCTAGGAGACAACACAAGGC-BHQ	
TLR8	NM_001313761.1 NM_001313760.1 NM_133212.3	F	AGGCAGCTTATTATGCCTACTT	92
		R	TGTATCAACTTCACCAGCATCT	
		P	FAM-TCAATCCCTAAGAACATTTGCCACTGT-BHQ	
TLR9	NM_031178.2	F	CTGCCTTGCTCTGTCTTACTAC	101
		R	AACTACCCTTTACAGCCAACC	
		P	FAM-TATATGCTACCAAGCCACCAGGCC-BHQ	
MDA5	NM_001164477.1 NM_027835.3	F	GGTTCAGGCTTGCTTCTTCT	88
		R	ACTCCCTTCATCATAAGAGATGATTAG	
		P	FAM-TCTTCTGCAAACACAGTACCATCCTGG-BHQ	
RIGI	NM_172689.3 NM_009517.2	F	CTGTATAGCTTTGGCTGTCCT	103
		R	CGCCTTTAATCCCAACACTTG	
		P	FAM-ACTCAGAAATCCGCCTTCCTCTGC-BHQ	
Hprt	NM_013556.2	F	GAAGCTCTCGATTTCCTATCAGT	107
		R	CAACGATTTACTGAAAGTGGGAAA	
		P	HEX-ACATGTTTCAGCAGTGTTGGCTGT-BHQ	

Окончание табл. 1 / End of Table 1

Ген	мРНК	Последовательности праймеров и TaqMan-зондов, 5′-3′		Длина продукта ПЦР, п.н.
Rplp0	NM_007475.5	F	CAAAGGAAGAGTCGGAGGAATC	98
		R	CTTTCTCAAATTAAGCAGGCTGAC	
		P	ROX-TCTTCGACTAATCCCGCCAAAGCA-BHQ2	
Ubc	NM_019639.4	F	CCCAGTGTTACCACCAAGAAG	103
		R	CCCATCACACCCAAGAACAA	
		P	Cy5-AGACAGACGTACCTTCCTCACCACA-BHQ2	
GAPDH	NM_001411843.1 NM_001411844.1 NM_001411841.1 NM_001289726.2 NM_008084.4 NM_001411840.1 NM_001411845.1 NM_001411842.1	F	AATGGTGAAGGTCGGTGTG	198
		R	ACAAGCTTCCCATTCTCGG	
		P	HEX-TTGACTGTGCCGTTGAATTTGCCG-BHQ1	

Подобранные праймеры выявляют все представленные в базе данных NCBI транскрипционные варианты мРНК исследуемых генов: по 3 для *TLR3* и *TLR8*, 6 для *TLR7*, 2 для *MDA5* и *RIGI*, по 1 известному варианту для *TLR9*, *Hprt*, *Rplp0* и все 8 канонических, выявленных для *GAPDH*. Для реализации мультиплексного формата ПЦР в разрабатываемой тест-системе были использованы TaqMan-зонды, содержащие различные флуоресцентные метки на 5′-конце: FAM, HEX, ROX и Cy5.

Для подбора оптимальных условий ПЦР, определения линейности и расчета эффективности амплификации в качестве матрицы ДНК были использованы плазмидные положительные контроли. Они были получены методом лигирования соответствующих ампликонов в линеаризованный вектор pAL-2T, накоплены в бактериальных штаммах DH5α и очищены с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген).

С использованием плазмидных положительных контролей была проведена оптимизация временного профиля ПЦР, в частности, мы оценили возможность применения двухступенчатого цикла ПЦР (денатурация и одновременный отжиг/элонгация при 60°С). Согласно полученным результатам, пороговые циклы ПЦР с двухступенчатым циклом практически не отличались от пороговых циклов ПЦР с трехступенчатым циклом, в котором отжиг проводили при 60°С, а элонгацию при 72°С (результаты не представлены). Далее для сокращения времени проведения ПЦР был использован двухступенчатый цикл.

Из подобранных праймеров сформировали группы, каждая из которых содержала ген интереса (*TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5* или *RIGI*), детектируемый по каналу FAM, и один из эндогенных контролей. Ген *Rplp0* был использован в качестве эндогенного контроля в нескольких группах, что позволило также оценить разброс данных, обусловленный постановкой в разных пробирках.

Для корректного проведения относительного количественного анализа экспрессии генов интереса в мультиплексном формате значения эффективностей амплификации соответствующих кДНК должны быть идентичными или максимально приближенными друг к другу. Поэтому далее при подобранных оптимальных условиях были рассчитаны эффективности проводимых ПЦР в мультиплексном формате (рис. 2). Расчет проводили по углу наклона стандартной кривой ПЦР, где в качестве матрицы кДНК использовали линейки десятикратных разведений полученных плазмидных положительных контролей. Рассчитанные эффективности амплификации для генов интереса составили 99% для *TLR3*, 106% для *TLR7* и по 107% для *TLR8*, *TLR9*, *MDA5* и *RIGI*. Для эндогенных контролей расчетные эффективности амплификации составили: 95% для *Rplp0*, 107% для *GAPDH*, 102% для *Hprt* и 109% для *Ubc*. Эффективности амплификации гена интереса и эндогенного контроля отличались друг от друга в каждой паре ПЦР не более чем на 10%. Данное значение является допустимой погрешностью при расчете уровней экспрессии с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ [8].

В результате оптимизации для мультиплексной ПЦР был выбран следующий температурный профиль: первичная денатурация 95°С — 5 мин; далее 40 двухступенчатых циклов: 1) денатурация 95°С — 10 с; 2) отжиг праймеров и элонгация цепи 60°С — 30 с.

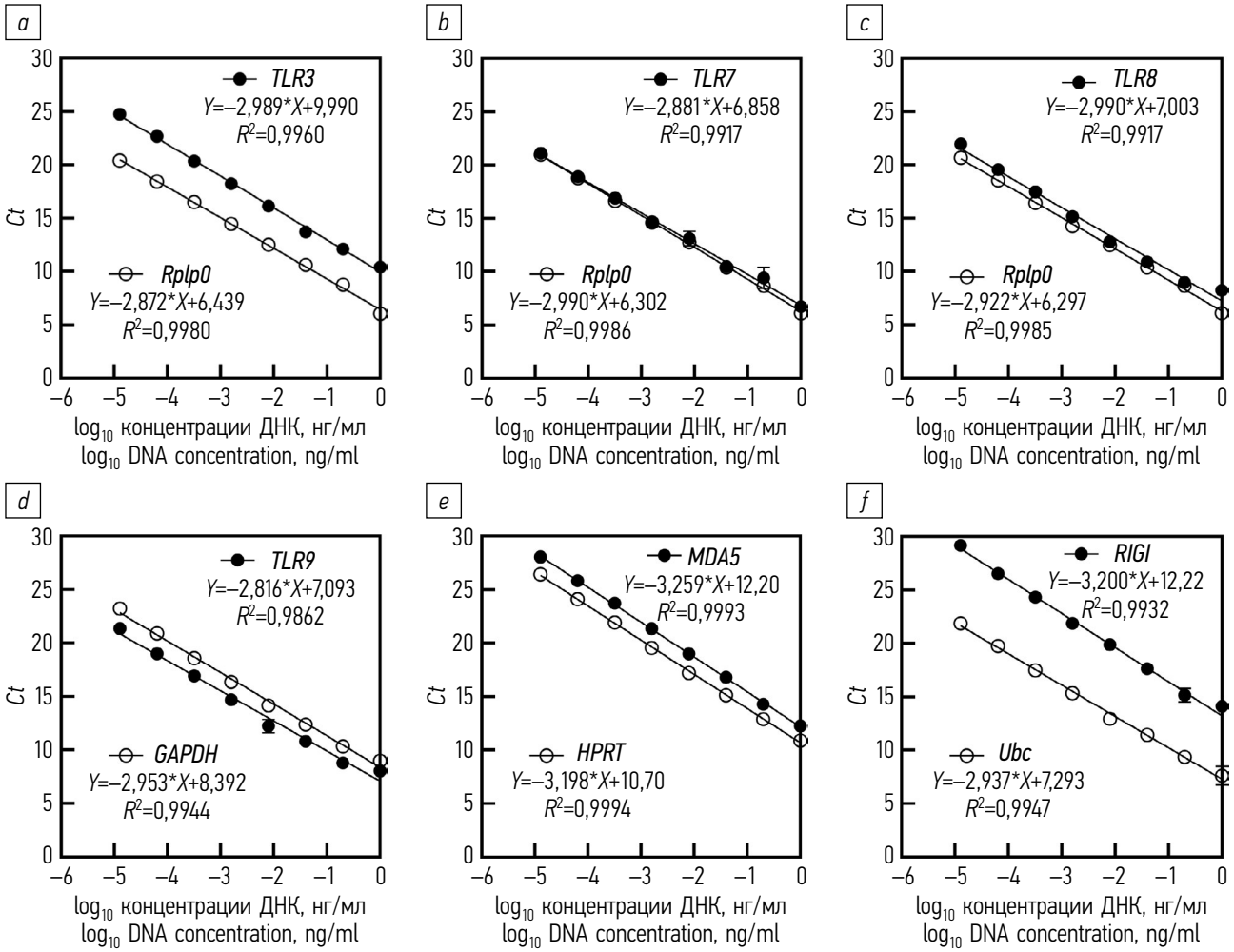

Рис. 2. Эффективность ПЦР в мультиплексном формате, стандартные калибровочные кривые: *a* — для генов *TLR3* и *Rplp0*; *b* — для генов *TLR7* и *Rplp0*; *c* — для генов *TLR8* и *Rplp0*; *d* — для генов *TLR9* и *GAPDH*; *e* — для генов *MDA5* и *Hprt*; *f* — для генов *RIGI* и *Ubc*.

Fig. 2. PCR efficiency in a multiplex format, standard calibration curves: *a*, for *TLR3* and *Rplp0* genes; *b*, for *TLR7* and *Rplp0* genes; *c*, for *TLR8* and *Rplp0* genes; *d*, for *TLR9* and *GAPDH* genes; *e*, for *MDA5* and *Hprt* genes; *f*, for *RIGI* and *Ubc* genes.

ПЦР была успешно апробирована на контрольных образцах, выделенных из различных органов мышей (селезенок, печени, легких, мононуклеарных клеток периферической крови). Критериями оптимизации были скорость накопления продуктов амплификации (*Ct*) и отсутствие неспецифических ампликонов при анализе продуктов ПЦР электрофоретическим разделением в агарозном геле (результаты не представлены).

Далее с использованием разработанной тест-системы были оценены уровни экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5* и *RIGI* в легких (для оценки активации местного иммунного ответа) и селезенках (для оценки возможной активации системного ответа) у мышей, интраназально инфицированных ВГА в сравнении с контрольной группой.

Во избежание случайных ошибок, обусловленных некорректным использованием нормировочных генов (для нормировки уровня экспрессии генов интереса были использованы четыре гена «домашнего хозяйства»), был проведен корреляционный анализ (см. рис. 1). Согласно полученным нами результатам, гены «домашнего хозяйства» *Ubc* и *Hprt* находятся в прямой (положительной) линейной связи с геном *Rplp0* с расчетными коэффициентами R^2=0,71 и 0,72 соответственно. Универсальный ген *GAPDH*, наиболее часто используемый в качестве эндогенного контроля, в нашем случае слабо коррелировал с нормировочным геном *Rplp0*.

Далее, согласно полученным результатам, для расчета относительного уровня экспрессии [9] при расчете ΔCt в качестве нормировочного значения *Ct* эндогенного контроля использовали среднее арифметическое пороговых циклов (включая технические повторы) генов *Ubc*, *Hprt* и *Rplp0* (но не *GAPDH*).

Согласно полученным нами результатам, инфицирование мышей ВГА индуцировало развитие врожденного иммунного ответа преимущественно локально (в легких), но не на системном

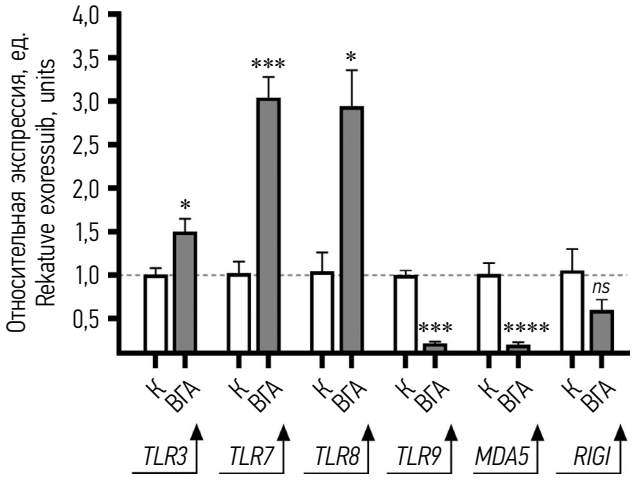

Рис. 3. Относительная экспрессия генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5* и *RIGI* в легких мышей через 24 ч после интраназального инфицирования вирусом гриппа A/PR8/34 (H1N1); группа интактных животных (К) показана белыми столбиками. Достоверность различий в уровнях экспрессии в опытной группе (ВГА) по сравнению с контрольной (К) определяли с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента: **p* <0,05; ****p* <0,001; *****p* <0,0001, *ns* — различия не значимы.

Fig. 3. Relative expression of *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5*, and *RIGI* genes in mouse lungs 24 h after intranasal infection with influenza A/PR8/34 (H1N1) virus; the group of intact animals (K) is shown with white bars. The significance of differences in expression levels in the experimental group (ВГА, IAV, influenza A virus) compared to the control group (K) was determined using an unpaired Student's *t*-test: **p* < 0.05; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001, *ns*, not significant.

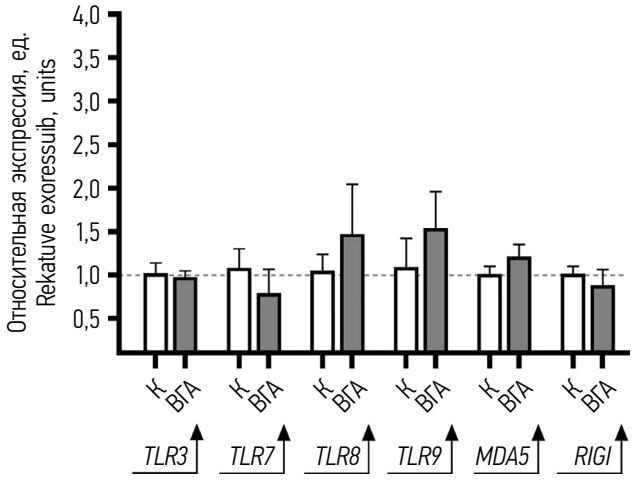

Рис. 4. Относительная экспрессия генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5* и *RIGI* в селезенках мышей через 24 ч после интраназального инфицирования вирусом гриппа A/PR8/34 (H1N1); группа интактных животных (К) показана белыми столбиками. Достоверность различий в уровнях экспрессии в опытной группе (ВГА) по сравнению с контрольной (К) определяли с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Статистически достоверных различий при сравнении опытной и контрольной группы не выявлено.

Fig. 4. Relative expression of *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5*, and *RIGI* genes in mouse spleens 24 h after intranasal infection with influenza A/PR8/34 (H1N1) virus; the group of intact animals (K) is shown with white bars. The significance of differences in expression levels in the experimental group (ВГА, IAV, influenza A virus) compared to the control group (K) was determined using an unpaired Student's *t*-test. No statistically significant differences were observed between the experimental and control groups.

(в селезенках) уровне. Как видно из рис. 3, в легких мышей в ответ на инфицирование ВГА статистически достоверно изменялась экспрессия всех исследуемых генов, кодирующих рецепторы нуклеиновых кислот, за исключением *RIGI*. Так, инфицирование ВГА приводило к 1,5–3,0-кратному повышению уровней мРНК эндосомальных рецепторов TLR3, TLR7 и TLR8, в то время как уровни транскриптов TLR9 и цитозольного сенсора MDA5 более чем в четыре раза снижались в ответ на заражение относительно контрольной группы.

При изучении уровней экспрессии генов эндосомальных рецепторов и цитозольных сенсоров нуклеиновых кислот в селезенках мышей (рис. 4) мы не выявили статистически достоверных различий между опытной и контрольной группами.

Обсуждение

Вирусы гриппа — серьезная причина заболеваемости и смертности во всем мире. Согласно отчетам ВОЗ, тяжелое протекание заболевания ежегодно приводит к 290–650 тыс. летальных исходов по всему миру [10]. Среди групп риска находятся пожилые люди, ранее сообщалось, что более 90% ежегодных смертей, связанных с гриппом, приходится на лиц в возрасте старше 65 лет [11]. Изучение иммунологических механизмов защиты от вирусных инфекций, в том числе от гриппа, — важный аспект проведения научных исследований при создании новых вакцинных препаратов.

Один из наиболее распространенных модельных организмов, используемых для исследования развития гриппозной инфекции, изучения формирования противовирусной защиты при вакцинации, тестирования новых иммунобиологических и противовирусных препаратов, — это лабораторные мыши. В нашем исследовании проведены разработка и апробация шести ПЦР-систем, позволяющих достоверно определять в органах и тканях мыши относительные уровни экспрессии (методами ΔCt и $\Delta\Delta Ct$) мРНК PRRs, имеющих ключевое значение при вирусной инвазии: TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, расположенных в основном на эндосомальных мембранах клетки, а также

внутриклеточных сенсоров MDA5 и RIG-I. Экспрессия этих генов, адекватное их функционирование и регуляция имеет огромное значение для обеспечения адекватного иммунного ответа и формирования противовирусной защиты. Представленные количественные ПЦР-наборы могут быть использованы для широкого спектра работ по определению экспрессии данных генов у мышей. Нами было предложено четыре гена «домашнего хозяйства» и показано, что *GAPDH* не подходит для нормировки, по крайней мере, для исследования экспрессии генов в легких, что согласуется с современными данными [12].

Далее мы использовали разработанную ПЦР-систему для исследования изменений экспрессии генов, кодирующих внутриклеточные PRRs, в легких и селезенках мышей через 24 ч после инфицирования летальной дозой ВГА. Вследствие интраназального введения и способности к пролиферации мы полагали, что в легких этот штамм ВГА будет стимулировать локальный иммунный ответ и вызывать активацию экспрессии этих рецепторов.

Известно, что интернализация ВГА в клетку осуществляется через эндосому путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Распознающие одноцепочечную РНК и расположенные на внутренних мембранах TLR7 и TLR8, активация и передача которых напрямую зависит от подкисления внутренней среды эндосомы, — это ключевые рецепторы, распознающие ВГА [13]. В нашей работе мы показали, что в ответ на инфицирование ВГА экспрессия TLR7 и TLR8 в легких зараженных мышей была увеличена примерно в три раза. В работе S. Koyama и соавт. [14] описано, что врожденное иммунное распознавание вируса гриппа и формирование первоначальных противовирусных реакций происходит с помощью TLR7/MyD88-зависимых и RLR/IPS-1-зависимых путей. В этой связи показанная нами активация экспрессии этих рецепторов вполне ожидаема.

Известно также, что избыточная экспрессия TLR7, индуцированная одноцепочечной РНК [15], усугубляет заболевание и может вызывать, например, волчанку у неаутоиммунных мышей, в то время как супрессия некоторых звеньев передачи сигнала или супрессия всего пути TLR7/MyD88 снижает большинство клинических проявлений и смертность [16]. Оценка величины изменений экспрессии рецепторов TLR7/TLR8 в ответ на различные подтипы ВГА, в том числе на штаммы, входящие в состав живой гриппозной вакцины, может быть актуальным прогностическим критерием для оценки развития качественного иммунного ответа.

TLR3, известный как рецептор двухцепочечной РНК, как показано в современной литературе [17, 18], играет патологическую роль в инфекции ВГА *in vivo*. В частности, TLR3 может действовать как вирусный сенсор, опосредующий вирусную трансактивацию путем усиления регуляции факторов транскрипции, таких как c-Jun, которые, в свою очередь, регулируют активность вирусного промотора [19, 20]. Блокирование TLR3, узнающего двухцепочечную РНК, приводит к снижению роста ВГА в первичной культуре клеток [21]. В нашем исследовании мы показали небольшое (в 1,5 раза) увеличение экспрессии TLR3 при инфицировании ВГА, что может быть следствием образования вирусных двухцепочечных РНК в процессе репликации генома вируса.

Интересно, что в наших экспериментах уровни TLR9 и MDA5 значимо снижались в ответ на интраназальное инфицирование мышей ВГА. Подавление иммунного ответа, индуцированного TLR9, который узнает вирусные и CpG-ДНК, — важная стратегия уклонения от иммунитета, используемая, например, вирусом Эпштейна–Барр [22]. Подавление уровня MDA5, агонистом которого являются двухцепочечные РНК, также требует дальнейшего подтверждения.

Изменения экспрессии исследуемых генов в селезенках инфицированных мышей были минимальны, достоверных отличий от группы контроля показано не было. В нашей работе исследование экспрессии проводили через 24 ч после инфицирования, к этому времени происходит 3–4 цикла репликации вируса, изменения экспрессии исследуемых генов *PRRs* в селезенке могут быть более выраженными на поздних стадиях инфицирования.

Заключение

TLRs играют важную роль в формировании специфичных для патогена гуморальных и клеточных адаптивных иммунных реакций. В представленном исследовании мы описываем разработанную и апробированную нами диагностическую ПЦР-систему, предназначенную для оценки уровня экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, *MDA5, RIGI* в органах и тканях лабораторных мышей. Изучение активации этих генов в патогенезе вирусных инфекций, а также других заболеваний, может стать важным этапом разработки и исследования активности новых профилактических и терапевтических средств.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (рег. № НИОКТР 124021200034-5).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическая экспертиза. Выполнение исследования одобрено биоэтической комиссией ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (протокол № 27 от 07.12.2023).
Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: *С.А. Клотченко*, *М.А. Плотникова*, *Е.А. Романовская-Романько* — идея работы, планирование экспериментов; *Н.Д. Ёлшин* — дизайн праймеров и олигонуклеотидных зондов; *С.А. Клотченко*, *В.А. Олейник*, *М.А. Плотникова*, *Е.А. Романовская-Романько* — проведение экспериментов; *В.А. Олейник*, *М.А. Плотникова* — анализ и интерпретация данных, написание и редактирование рукописи.

Additional information

Funding source: This study was conducted as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (No. 124021200034-5).
Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.
Ethics approval: Research received approval from the local ethical commission of the Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, St. Petersburg, Russia (sessions No. 27 dated 07.12.2023).
Author contribution: All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.
Personal contribution of each author: *S.A. Klotchenko, M.A. Plotnikova*, and *E.A. Romanovskaya-Romanko:* idea of the work, planning of experiments; *N.D. Yolshin:* design of primers and oligonucleotide probes; *S.A. Klotchenko, V.A. Oleynik, M.A. Plotnikova,* and *E.A. Romanovskaya-Romanko:* conducting experiments; *V.A. Oleynik, M.A. Plotnikova:* analyses and interpretation of data, writing and editing the manuscript.

Список литературы

1. Sellge G., Kufer T.A. PRR-signaling pathways: learning from microbial tactics // Semin Immunol. 2015. Vol. 27, N 2. P. 75–84. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.009
2. Kouwaki, T., Nishimura, T., Wang, G., & Oshiumi, H. RIG-I-like receptor-mediated recognition of viral genomic RNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 and viral escape from the host innate immune responses // Frontiers in immunology. 2021. Vol. 12, P. 700926. doi: 10.3389/fimmu.2021.700926
3. Hayden M.S., Ghosh S. NF-κB in immunobiology // Cell Res. 2011. Vol. 21, N 2. P. 223–244. doi: 10.1038/cr.2011.13
4. Kayesh M.E.H., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into the molecular mechanisms of the toll-like receptor response to influenza virus infection // Int J Mol Sci. 2024. Vol. 25, N 11. P. 5909. doi: 10.3390/ijms25115909
5. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors // Nat Immunol. 2010. Vol. 11, N 5. P. 373–384. doi: 10.1038/ni.1863
6. Zarember K.A., Godowski P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines // J Immunol. 2002. Vol. 168, N 2. P. 554–561. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.554
7. Masek T., Vopalensky V., Suchomelova P., Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels // Anal Biochem. 2005. Vol. 336, N 1. P. 46–50. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.010
8. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // Nat Protoc. 2006. Vol. 1, N 3. P. 1559–1582. doi: 10.1038/nprot.2006.236
9. Mosley Y.Y.C., HogenEsch H. Selection of a suitable reference gene for quantitative gene expression in mouse lymph nodes after vaccination // BMC Res notes. 2017. Vol. 10. P. 1–7. doi: 10.1186/s13104-017-3005-y
10. Influenza (Seasonal) [Электронный ресурс] // WHO. 2023 Oct 3. Режим доступа: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal). Дата обращения: 12.03.2025.
11. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E., et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States // JAMA. 2003. Vol. 289, N 2. P. 179–186. doi: 10.1001/jama.289.2.179
12. Giri A., Sundar I.K. Evaluation of stable reference genes for qPCR normalization in circadian studies related to lung inflammation and injury in mouse model // Sci Rep. 2022. Vol. 12, N 1. P. 1764. doi: 10.1038/s41598-022-05836-1
13. Wang J.P., Bowen G.N., Padden C., et al. Toll-like receptor–mediated activation of neutrophils by influenza A virus // Blood. 2008. Vol. 112, N 5. P. 2028–2034. doi: 10.1182/blood-2008-01-132860
14. Koyama S., Ishii K.J., Kumar H., et al. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination // J Immunol. 2007. Vol. 179, N 7. P. 4711–4720. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4711
15. Hornung V., Barchet W., Schlee M., Hartmann G. RNA recognition via TLR7 and TLR8 // Handb Exp Pharmacol. 2008. Vol. 183. P. 71–86. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3_4
16. Koh Y.T., Scatizzi J.C., Gahan J.D., et al. Role of nucleic acid–sensing tlrs in diverse autoantibody specificities and anti-nuclear antibody–producing B cells // J Immunol. 2013. Vol. 190, N 10. P. 4982–4990. doi: 10.4049/jimmunol.1202986
17. Goffic R.L., Balloy V., Lagranderie M., et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus-induced acute pneumonia // PLoS Pathog. 2006. Vol. 2, N 6. P. e53. doi: 10.1371/journal.ppat.0020053
18. Majde J.A., Kapás L., Bohnet S.G., et al. Attenuation of the influenza virus sickness behavior in mice deficient in Toll-like re-

ceptor 3 // Brain Behav Immun. 2010. Vol. 24, N 2. P. 306–315. doi: 10.1016/j.bbi.2009.10.011
19. Bhargavan B., Woollard S.M., Kanmogne G.D. Toll-like receptor-3 mediates HIV-1 transactivation via NFκB and JNK pathways and histone acetylation, but prolonged activation suppresses Tat and HIV-1 replication // Cell Signal. 2016. Vol. 28, N 2. P. 7–22. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.11.005
20. Xie J., Zhang S., Hu Y., et al. Regulatory roles of c-jun in H5N1 influenza virus replication and host inflammation // Biochim Biophys Acta. 2014. Vol. 1842, N 12 Pt A. P. 2479–2488. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.017
21. Meng D., Huo C., Wang M., et al. Influenza a viruses replicate productively in mouse mastocytoma cells (P815) and trigger pro-inflammatory cytokine and chemokine production through TLR3 signaling pathway // Front Microbiol. 2017. Vol. 7. P. 2130. doi: 10.3389/fmicb.2016.02130
22. Zhang X., Li Z., Peng Q., et al. Epstein-Barr virus suppresses N6-methyladenosine modification of TLR9 to promote immune evasion // J Biol Chem. 2024. Vol. 300, N 5. P. 107226. doi: 10.1016/j.jbc.2024.107226

References

1. Sellge G, Kufer TA. PRR-signaling pathways: learning from microbial tactics. *Semin Immunol.* 2015;27(2):75–84. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.009
2. Kouwaki, T., Nishimura, T., Wang, G., & Oshiumi, H. RIG-I-like receptor-mediated recognition of viral genomic RNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 and viral escape from the host innate immune responses // Frontiers in immunology. 2021. Vol. 12, P. 700926. doi: 10.3389/fimmu.2021.700926
3. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB in immunobiology. *Cell Res.* 2011;21(2):223–244. doi: 10.1038/cr.2011.13
4. Kayesh MEH, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into the molecular mechanisms of the toll-like receptor response to influenza virus infection. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):5909. doi: 10.3390/ijms25115909
5. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373–384. doi: 10.1038/ni.1863
6. Zarember KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002;168(2):554–561. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.554
7. Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal Biochem.* 2005;336(1):46–50. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.010
8. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559–1582. doi: 10.1038/nprot.2006.236
9. Mosley YYC, HogenEsch H. Selection of a suitable reference gene for quantitative gene expression in mouse lymph nodes after vaccination. *BMC Res notes.* 2017;10:1–7. doi: 10.1186/s13104-017-3005-y
10. Influenza (Seasonal) [Internet]. *WHO.* 2023 Oct 3. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal). Accessed: 12 March 2025.
11. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA.* 2003;289(2):179–186. doi: 10.1001/jama.289.2.179
12. Giri A, Sundar IK. Evaluation of stable reference genes for qPCR normalization in circadian studies related to lung inflammation and injury in mouse model. *Sci Rep.* 2022;12(1):1764. doi: 10.1038/s41598-022-05836-1
13. Wang JP, Bowen GN, Padden C, et al. Toll-like receptor–mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood.* 2008;112(5):2028–2034. doi: 10.1182/blood-2008-01-132860
14. Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, et al. Differential role of TLR-and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol.* 2007;179(7):4711–4720. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4711
15. Hornung V, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;183:71–86. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3_4
16. Koh YT, Scatizzi JC, Gahan JD, et al. Role of nucleic acid–sensing tlrs in diverse autoantibody specificities and anti-nuclear antibody–producing B cells. *J Immunol.* 2013;190(10):4982–4990. doi: 10.4049/jimmunol.1202986
17. Goffic RL, Balloy V, Lagranderie M, et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus–induced acute pneumonia. *PLoS Pathog.* 2006;2(6):e53. doi: 10.1371/journal.ppat.0020053
18. Majde JA, Kapás L, Bohnet SG, et al. Attenuation of the influenza virus sickness behavior in mice deficient in Toll-like receptor 3. *Brain Behav Immun.* 2010;24(2):306–315. doi: 10.1016/j.bbi.2009.10.011
19. Bhargavan B, Woollard SM, Kanmogne GD. Toll-like receptor-3 mediates HIV-1 transactivation via NFκB and JNK pathways and histone acetylation, but prolonged activation suppresses Tat and HIV-1 replication. *Cell Signal.* 2016;28(2):7–22. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.11.005
20. Xie J, Zhang S, Hu Y, et al. Regulatory roles of c-jun in H5N1 influenza virus replication and host inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(12 Pt A):2479–2488. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.017
21. Meng D, Huo C, Wang M, et al. Influenza a viruses replicate productively in mouse mastocytoma cells (P815) and trigger pro-inflammatory cytokine and chemokine production through TLR3 signaling pathway. *Front Microbiol.* 2017;7:2130. doi: 10.3389/fmicb.2016.02130
22. Zhang X, Li Z, Peng Q, et al. Epstein-Barr virus suppresses N6-methyladenosine modification of TLR9 to promote immune evasion. *J Biol Chem.* 2024;300(5):107226. doi: 10.1016/j.jbc.2024.107226

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия
Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Saint Petersburg, Russia

Олейник Вероника Андреевна — лаборант-исследователь лаборатории гриппозных вакцин; студент.
ORCID: 0000-0003-3987-8817;
e-mail: working.lyutik@gmail.com

Veronika A. Oleynik — Research Laboratory Assistant at the Laboratory of Influenza Vaccines; student.
ORCID: 0000-0003-3987-8817;
e-mail: working.lyutik@gmail.com

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia

Плотникова Марина Александровна — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории векторных вакцин.
ORCID: 0000-0001-8196-3156;
eLibrary SPIN: 2986-9850;
e-mail: biomalinka@mail.ru

Marina A. Plotnikova, Cand. Sci. (Biology), Senior Research Associate at the Laboratory of Vector Vaccines.
ORCID: 0000-0001-8196-3156;
eLibrary SPIN: 2986-9850;
e-mail: biomalinka@mail.ru

Ёлшин Никита Дмитриевич — научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии.
ORCID: 0000-0002-1050-5817;
eLibrary SPIN: 1878-0020;
e-mail: nikita.yolshin@gmail.com

Nikita D. Yolshin, Research Associate at the Laboratory of Molecular Virology.
ORCID: 0000-0002-1050-5817;
eLibrary SPIN: 1878-0020;
e-mail: nikita.yolshin@gmail.com

Романовская-Романько Екатерина Андреевна — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин.
ORCID: 0000-0001-7560-398X;
eLibrary SPIN: 1012-8043;
e-mail: ekaterina.romanovskaya@influenza.spb.ru

Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko, Cand. Sci. (Biology), Leading Research Associate at the Laboratory of Vector Vaccines.
ORCID: 0000-0001-7560-398X;
eLibrary SPIN: 1012-8043;
e-mail: ekaterina.romanovskaya@influenza.spb.ru

Клотченко Сергей Анатольевич — канд. биол. наук, заведующий лабораторией гриппозных вакцин.
ORCID: 0000-0003-0289-6560;
eLibrary SPIN: 2632-6195;
e-mail: fosfatik@mail.ru

Sergey A. Klotchenko, Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Influenza Vaccines.
ORCID: 0000-0003-0289-6560;
eLibrary SPIN: 2632-6195;
e-mail: fosfatik@mail.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Клотченко Сергей Анатольевич / Sergey A. Klotchenko
Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 15/17
Address: 15/17 Professor Popov St., Saint Petersburg, 197022, Russia
E-mail: fosfatik@mail.ru